6. Каюмов Ф.Г. Продуктивные качества калмыцких помесей / Ф.Г. Каюмов, В.К. Еременко, А.Ф. Чемоданов // Зоотехния. - 1999.-№2.- с.23-25.

7. Клейменов Н.И. Системы выращивания крупного рогатого скота / Н.И. Клейменов, В.Н. Клейменов, А.Н. Клейменов. - М.: Росагропромиздат, 1989. - 320 с.

8. Петров Е.Б. Технологические и экономические аспекты производства говядины. / Е.Б. Петров, А.И. Чертоляс, Ю. Кранц. // Рекомендации. – Москва - 2007 г.- МСХ, ФГУП «ГВЦ Минсельхоза России», с. 36.

9. Сипатый Д.В.Льняное семя в стартерных комбикормах для телят [Телята молочного периода] / Д.В. Сипатый, М.П. Кирилов, В.Н. Виноградов, Н.И. Анисова, Р.З. Фатрахманов. // Научные основы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных / Яросл. науч.-исслед. ин-т животноводства и кормопроизводства. - Ярославль, 2009.-С. - 155-158.

10. Топурия Г.М., Чернокожев А.И. Применение Гермивита при выращивании телят. – Краснодар. – Ветеринария Кубани, № 3, 2010. – с. 7-8.

Контактная информации об авторах для переписки

Махаринец Галина Григорьевна, кандидат биологических наук, заведующая отделом животноводства ГНУ ДЗНИИСХ, e-mail: dzniisx@aksay.ru

Добрелин Вадим Иванович, кандидат ветеринарных наук, заместитель заведующего лабораторией молочного и мясного скотоводства ГНУ ДЗНИИСХ

УДК 579.252.55:615.332:579.25:577.212.3

Семенихин В. И., Юрик С. А.

(ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Россельхозакадемии)

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ НА ПОДВИДЫ С ПОМОЩЬЮ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ ГОМОФЕРМЕНТАТИВНЫХ МЕЗОФИЛЬНЫХ ЛАКТОКОККОВ

Ключевые слова: штамм, культура, Lactococcus lactis subspecies cremoris, subspecies lactis, ДНК, ПЦР, праймер.

При производстве сметаны, творога и других кисломолочных продуктов в качестве одного из компонентов бактериальной закваски используют гомоферментативные мезофильные Lactococcus lactis. При типировании штаммов и изолятов Lactococcus lactis на подвиды применяют несколько методов, где основным является способ, основанный на изучении биологических и биохимических свойств и сопоставлении полученных данных с данными дифференциальной таблицы 17.8. определителя микроорганизмов Берджи [1]. Это позволяет определить видовую принадлежность тестируемых лактококков.

В последующем рядом исследователей были использованы различные способы дифференциации лактококков, основанные на анализе ДНК гена 16S rRNA Lactococcus lactis. Так применялся метод, основанный на использовании RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA) для 16S rRNA гена. Осуществлялся синтез, затем проводился электрофорез и сравнение фингерпринтов данного гена с фингерпринтами, полученными одновременно на референтные штаммы Lactococcus lactis и делалось заключение о принадлежности исследуемой культуры к subspecies lactis или subspecies cremoris [2].

Другим приемом для определения видовой принадлежности является RFLP(restriction fragment length polymorphisms) анализ, включающий синтез олигонуклеотидных праймеров на ген gadB Lactococcus lactis subspecies lactis, проведение ПЦР, гидролиз эндонуклеазой рестрикции AseI и электрофорез. Затем сравниваются паттерны данного гена с паттернами, полученными одновременно на референтные штаммы Lactococcus lactis subspecies lactis, делается заключение о принадлежности исследуемой культуры [3]. В другом варианте специфичность полученных паттернов для subspecies cremoris и subspecies lactis подтверждалась гибридизацией в не радиоактивном варианте. [4].

К недостаткам вышеназванных методов можно отнести в первом случае необходимость проведения большого числа биохимических дифференцирующих тестов, а во втором – при идентификации культуры лактококков помимо постановки ПЦР необходимо осуществлять гидролиз ампликонов эндонуклеазами, гибридизацию с ДНК-зондом и сравнение с референтными культурами, что обуславливает длительность процесса тестирования и высокую его стоимость.

Целью наших исследований было разработать способ мономорфного маркирования нуклеотидных последовательностей при помощи специфических синтетических олигонуклеотидных праймеров в ПЦР с использованием в качестве молекулярной мишени ДНК генов транспозонов Lactococcus lactis subspecies lactis и Lactococcus lactis subspecies cremoris.

Материалы и методы исследования

Исследованию были подвергнуты культуры Lactococcus lactis, выделенные в разные годы в лаборатории микробиологии ГБНУ СибНИИС Россельхозакадемии (г. Барнаул). Для выделения ДНК с помощью 10% STAB брали суспензии штаммов и культур, выращенных на питательном бульоне из гидролизованного молока (БГМ).

Выбор специфических праймеров осуществляли на основе выбранных фрагментов ДНК, характерных для Lactococcus lactis subspecies lactis и subspecies cremoris, при анализе полных геномов референтных штаммов, представленных в базе данных GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank Search.html). Химический синтез праймеров осуществляли амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе ASM-102U (Biosset Ltd, Новосибирск). Концентрацию олигонуклеотидных праймеров в маточном растворе определяли спектрометрическим методом.

Постановку ПЦР проводили на амплификаторах «Бис» М-105. О результатах судили по размеру синтезированного фрагмента ДНК, мигрирующего в 1,0%-м геле агарозы при силе тока 35–40 мА. В качестве маркера использовали ДНК pBLSKII(+), гидролизованную MspI. Документирование полученных результатов проводили с помощью цифровой фотокамеры.

Секвенирование ампликонов выполнили по двум цепочкам ДНК, используя общепринятые методики Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук [5] и Максама-Гилберта [6].

Результаты и обсуждение

Праймеры. Поиск специфических праймеров осуществляли на основе выбранных фрагментов ДНК генов транспозонов, характерных только для Lactococcus lactis subspecies cremoris и, соответственно, для subspecies lactis. Провели анализ полных геномов референтных штаммов Lactococcus lactis ssp. cremoris: MG1363, NZ9000, SK11, и ssp. lactis: IL1403, KF147, CRL264, представленные в базе данных GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank Search.html). Выбранные фрагменты ДНК тестировали с помощью программы Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Окончательный выбор праймеров 12F-12R для ssp. cremoris и 83F-83R для ssp. lactis основывался на следующих критериях: высокий уровень сходства соответствующих специфических фрагментов ДНК Lactococcus lactis subspecies(ssp.) cremoris и Lactococcus lactis subspecies(ssp.) lactis с ДНК различных штаммов этой бактерии. Олигонуклеотиды были комплементарны последовательностям специфических фрагментов ДНК ssp. cremoris и ssp. lactis, не образовывали димеры.

Выделение ДНК. При выделении из бактериальной культуры лактококков клетки осаждали в бляшку центрифугированием 1-2 мин при 5500-6000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли. 50 мкл культуры добавляли к 350 мкл подогретого до +80 С 10% STAB, перемешивали и инкубировали 30 минут. Экстрагирование ДНК проводили с помощью смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1). Из водной фазы ДНК осаждали двумя объемами этанола, затем высушивали при +37 С в течение 25 мин и растворяли в 40 мкл автоклавированной бидистиллированной воды.

Проведение полимеразной цепной реакции.

Состав реакционной смеси для каждой исследуемой пробы ДНК 2,5 мкл 10х буфера (650 мМ трис-HCl pH 8,9; 160 мМ (NH)4SO4; 30 мМ MgCl; 0,5% Tvin-20); 2,5 мкл 2,5 мМ dNTP, 2,5 мкл 0,25 мкМ каждого праймера; 0,5 мкл 2,5 е.а. Taq-ДНК полимеразы; 2-3 мкл пробы ДНК и автоклавированной бидистиллированной воды до 25 мкл. Температурный режим проведения ПЦР: прогревание реакционной смеси при 95°С в течение 3 мин – 1 цикл, затем денатурация при 94°С 0,2 мин, отжиг при 60°С 0,2 мин, элонгация при 72°С 0,4 мин – 40 циклов и досинтез при 72°С в течение 0,8 мин

– 1 цикл.

Определение размера продуктов ПЦР. Продукты ПЦР визуализировали методом электрофореза в 0,5х трис-боратном буфере, который проводили в 1%-ном геле агарозы с бромистым этидием при силе тока 40 мА в течение 25–30 мин. 12,5 мкл продуктов ПЦР смешивали с 3 мкл буфера для нанесения и вносили в лунки геля под электрофорезный буфер. Электрофорез проводили до тех пор, пока краситель пройдет от старта не менее 2,5-3,5 см геля (примерно 35 минут). Результаты учитывали с помощью трансиллюминатора, просматривая гель в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм. Анализ считали положительным, если размер ампликона соответствовал ожидаемому размеру фрагмента ДНК ssp. lactis в 449 н.п., а фрагмента ДНК ssp. cremoris – в 334 н. п.

Таблица – Результаты исследований по определению специфичности ПЦР по выявлению *Lactococcus lactis ssp. cremoris* и *ssp. lactis*

№ п/п	**Наименование культуры**	**ПЦР с праймерами**	
		***ssp. cremoris* 12F -12R**	***ssp.s lactis* 83F- 83R**
1	Staphylococcus aureus	Отрицательно	Отрицательно
2	Staphylococcus albus	Отрицательно	Отрицательно
3	Streptococcus epidermitis	Отрицательно	Отрицательно
4	Streptococcus pyogenes	Отрицательно	Отрицательно
5	Escherihia coli	Отрицательно	Отрицательно
6	Proteus vulgaris	Отрицательно	Отрицательно
7	Streptococcus termophilus 124 Коллекция ГНУ СибНИИС	Отрицательно	Отрицательно
8	Streptococcus termophilus 28-2 Коллекция ГНУ СибНИИС	Отрицательно	Отрицательно
9	Lactoc. lactis ssp. lactis 174 Коллекция ГНУ СибНИИС	Отрицательно	Положительно
10	Lactoc. lactis ssp. cremoris C9182 Коллекция ГНУ СибНИИС	Положительно	Отрицательно
11	Lactoc. lactis ssp. cremoris 1614 Коллекция ГНУ СибНИИС	Положительно	Отрицательно
12	Lactoc. lactis ssp. cremoris 3M-5 Коллекция ГНУ СибНИИС	Положительно	Отрицательно
13	Lactoc. lactis ssp. cremoris E8 Коллекция ГНУ СибНИИС, Барнаул	Положительно	Отрицательно
14	Lactoc. lactis ssp. lactis №49 Коллекция ГНУ СибНИИС, Барнаул	Отрицательно	Положительно
15	Lactoc. lactis ssp. lactis 283 Коллекция ГНУ СибНИИС, Барнаул	Отрицательно	Положительно
16	Lactoc. lactis ssp. lactis 344-4 Коллекция ГНУ СибНИИС, Барнаул	Отрицательно	Положительно
17	Lactoc. lactis ssp. lactis 430-4 Коллекция ГНУ СибНИИС, Барнаул	Отрицательно	Положительно
18	Lactococcus lactis subsp. lactis 505-2 Коллекция ГНУ СибНИИС, Барнаул	Отрицательно	Положительно
19	Lactobac. acidophilus La 5 Коллекция ГНУ СибНИИС	Отрицательно	Отрицательно
20	Lactobac. delbr. ssp. bulgaricus 630 Коллекция ГНУ СибНИИС	Отрицательно	Отрицательно
21	Дистиллированная вода	Отрицательно	трицательно

Определение специфичности ПЦР. Обобщенные результаты серии исследований по определению специфичности ПЦР с праймерами 12F-12R и 83F-83R представлены в таблице, которые показывают, что по¬ложительные анализы продуктов ПЦР получали только тогда, когда в качестве матрицы использовали ДНК фрагмента генов tranposase, характерные только для Lactococcus lactis ssp. cremoris и, соответственно, для Lactococcus lactis ssp. lactis. Анализы были отрицательными, когда использовали ДНК других бактерий.

Для подтверждения специфичности синтезируемых фрагментов ДНК, характерных для Lactococcus lactis ssp. cremoris, наработали их с праймерами 12F-12R на матрице ДНК штамма Lactococcus lactis ssp. cremoris str. 3M-5. Аналогично поступили с фрагментами для Lactococcus lactis ssp. Lactis, полученных с праймерами 83F-83R на матрице ДНК штамма Lactococcus lactis ssp. lactis str. 49 . Затем провели их секвенирование.

Анализ нуклеотидных последовательностей синтезируемых ампликонов с помощью праймеров 12F-12R и 83F-83R провели методом выравнивания с опубликованными последовательностями полных геномов референтных штаммов Lactococcus lactis ssp. cremoris и ssp. lactis (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ GenBank Search.html). Установили, что рассматриваемые нуклеотидные последовательности ампликонов исследуемых штаммов Lactococcus lactis ssp. cremoris str. 3M-5 и Lactococcus lactis ssp. lactis str. 49 совпадали соответственно с опубликованными нуклеотидными последовательностями референтных штаммов.

Таким образом, разработанные синтетические олигонуклеотидные праймеры 12F-12R и 83F-83R для выявления фрагментов ДНК, характерных только для Lactococcus lactis subspecies cremoris и Lactococcus lactis subspecies lactis обладают специфичностью и позволяют проводить дифференциацию на подвиды штаммов и культур Lactococcus lactis, используемых в заквасочных культурах при производстве кисломолочных продуктов.

Резюме: Разработанные синтетические олигонуклеотидные праймеры 12F-12R и 83F-83R для выявления Lactococcus lactis subspecies cremoris и Lactococcus lactis subspecies lactis обладают специфичностью и позволяют проводить дифференциацию на подвиды штаммов Lactococcus lactis, используемых в заквасочных культурах при производстве кисломолочных продуктов.

SUMMARY

The developed synthetic oligonucleotide primers 12F-12R, and 83F-83R to detect DNA fragments unique to the Lactococcus lactis subspecies cremoris and Lactococcus lactis subspecies lactis possess specificity and allow differentiation to the subspecies strains and cultures Lactococcus lactis, starter cultures used in the manufacture of dairy products .

Keywords: strain, culture, Lactococcus lactis subspecies cremoris, subspecies lactis, DNA, PCR primer.

Литература

1.Определитель бактерий Берджи. В 2-х т.–Т.2. – Под ред. Дж.Хоултa, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльмса. – М.: Мир. – 1997. – С. 538-566.

2.J. Prod lalov ,A. panov and B. Rittich Application of PCR, rep-PCR and RAPD techniques for typing of Lactococcus lactis strains// Folia Microbiologica – 2005. –vol. 50. –№ 2. – P. 150-154.

3. M. Nomura, M. Kobayashi, and T. Okamoto Rapid PCR-Based Method Which Can Determine Both Phenotype and Genotype of Lactococcus lactis Subspecies// Applied and Environmental Microbiology. May 2002. – vol. 68. – № 5. – P. 2209-2213.

4. Ward L.J. Two methods for the genetic differentiation of Lactococcus lactis ssp. lactis and cremoris based on differences in the 16S rRNA gene sequence/ L.J. Ward, J.C. Brown, G. P. Davey //FEMS Microbiol Lett. – 1998. – vol. 166. – №1. – P. 15–20.

5. Маниатис Т. Молекулярное клонирование / Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. – М.: Мир, 1984. — С. 205–240.

6. Maxam F.M., Gilbert W. In: Methods in Ensymology. — 1980. — Vol. 65. — Part. I. — P. 499–550.

Контактная информации об авторах для переписки

Владимир Иванович Семенихин, доктор биологических наук, заведующий лаборатории генной инженерии ГНУ ИЭВСиДВ Россельхозакадемии, служебный (383) 348-57-09; E-mail: vsemenikhin@mail.ru

София Антоновна Юрик, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генной инженерии ГНУ ИЭВСиДВ Россельхозакадемии, служебный (383) 348-57-09, государственное научное учреждение Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Россельхозакадемии, 630501, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Краснообск, а/я 8